



TITLE:

Identification of a Dual Inhibitor of SRPK1 and CK2 that Attenuates Pathological Angiogenesis of Macular Degeneration in Mice.(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Morooka, Satoshi

CITATION:

Morooka, Satoshi. Identification of a Dual Inhibitor of SRPK1 and CK2 that Attenuates Pathological Angiogenesis of Macular Degeneration in Mice.. 京都大学, 2015, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2015-11-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19364>

RIGHT:

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	諸 岡 諭
論文題目	Identification of a Dual Inhibitor of SRPK1 and CK2 that Attenuates Pathological Angiogenesis of Macular Degeneration in Mice (リン酸化酵素 SRPK1/CK2 に対する特異的阻害剤は、加齢黄斑変性モデルマウスにおいて病的血管新生を抑制する)		
(論文内容の要旨)			
<p>【背景】血管新生は生体に重要な現象であるが、病的血管新生を伴う疾患も数多く存在する。血管新生には Vascular endothelial growth factor (VEGF)が関与しており、病的血管新生を伴う疾患に対し、抗 VEGF 治療が行われている。眼内血管新生疾患のひとつである加齢黄斑変性に対し、抗 VEGF 抗体硝子体注射による治療が行われているが、硝子体注射は感染や出血等の合併症のリスクがある。また治療無効例もあり、新たなターゲットの探索や局所治療薬の開発が望まれている。これまで我々が開発した Serine/arginine protein kinase (SRPK)阻害剤 SRPIN340 は VEGF を介し、眼内血管新生を抑制することが報告されているが、今回 SRPIN340 より高い血管新生阻害効果を有し、局所薬として使用できる新規低分子化合物取得を目的とした化合物スクリーニングを行った。</p> <p>【方法と結果】今回東京大学創薬機構が有する約 72000 種の化合物ライブラリを使用し、化合物スクリーニングを行った。In silico スクリーニング、および SRPK1 をターゲットとした In vitro kinase アッセイにより、SRPK1 の活性を 90%以上阻害する化合物 SRPIN803 を取得した。ドッキングシュミレーションにて SRPIN803 と SRPK1 の結合を確認したところ、SRPIN803 は SRPIN340 と同様に SRPK1 の ATP 結合ポケットに結合していることがわかった。</p> <p>続いて SRPIN803 を合成した後、薬効確認を行った。まず SRPIN803 の VEGF 阻害活性を確認するため、網膜色素上皮細胞(ARPE-19)に SRPIN803 10μM を添加し、VEGF mRNA および VEGF タンパクを定量 PCR、ELISA を施行した。その結果、細胞中の VEGF mRNA および培養液中の VEGF タンパク濃度の低下を認めた。</p> <p>次に SRPIN803 のキナーゼ阻害特異性を確認するため、in vitro kinase アッセイにて 306 種のキナーゼ阻害活性を測定したところ、50%以上の阻害を認めるキナーゼは SRPK1 と Casein kinase 2(CK2)のみであり、SRPIN803 がキナーゼ特異性の高い化合物であることが分かった。ここで CK2 阻害による VEGF 発現低下を確認するため、ARPE-19 細胞への CK2 siRNA 導入によるノックダウン実験を施行し、細胞中の VEGF mRNA および培養液中の VEGF タンパク濃度の低下を認めた。</p> <p>最後にこれまで加齢黄斑変性モデルマウスとして使用されているレーザー照射脈絡膜新生血管モデルマウスを用い、SRPIN803 の血管新生阻害効果を確認した。まず SRPIN803 の硝子体注射を行い、SRPIN803 が SRPIN340 より高い血管新生阻害効果を有すること、および濃度依存的に血管新生を阻害することを確認した。次に SRPIN803 10%眼軟膏を作成し、1 日 3 回 7 日間モデルマウスの眼表面に眼軟膏を塗布した結果、基剤のみのコントロール眼軟膏より有意に血管新生を阻害した。</p> <p>【結論】今回化合物スクリーニングによって、血管新生阻害効果を有する SRPK1 と CK2 の dual inhibitor である SRPIN803 を取得した。加齢黄斑変性モデルマウスにて、眼軟膏剤でも血管新生阻害効果を認めたことから、SRPIN803 は今後抗 VEGF 抗体硝子体注射に代わる治療薬になる可能性があると考える。</p>			

<p>（論文審査の結果の要旨）</p> <p>加齢黄斑変性も含め、多くの眼内血管新生疾患に対し、抗 VEGF 治療が行われているが、現行の治療は硝子体注射が必要であり、感染などの合併症のリスクがある。そのため点眼剤や軟膏剤などの局所治療薬の開発が望まれている。これまで Serine-Arginine protein kinase (SRPK)阻害剤が VEGF 発現抑制を介し、新生血管を阻害するという報告があり、本研究では SRPK1 をターゲットとした化合物スクリーニングにより、新規血管新生阻害局所薬の探索を行った。</p> <p>約 72000 種の化合物ライブラリを用い、In silico スクリーニングおよび SRPK1 をターゲットとした In vitro kinase アッセイにより、新規 SRPK1 阻害化合物 SRPIN803 を取得した。この SRPIN803 を網膜色素上皮細胞に投与すると、VEGF 発現抑制が確認された。キナーゼ特異性を確認するために行った、306 種類の in vitro kinase アッセイの結果から、SRPIN803 は SRPK1 以外に、Casein kinase 2 (CK2)のみを阻害することが分かり、網膜色素上皮細胞にて、SRPK 1 および CK2 をノックダウンすると、それぞれ VEGF の発現低下を認めたことから、SRPIN803 は SRPK1/CK2 を阻害することにより VEGF の発現を低下させると考えられた。脈絡膜新生血管モデルマウスを用いた動物実験では、SRPIN803 硝子体注射で濃度依存的に血管新生阻害効果を認め、さらに SRPIN803 10%眼軟膏剤塗布により、コントロール眼軟膏と比較して有意に血管新生阻害効果を認めた。</p> <p>以上の研究は、既存の抗 VEGF 抗体に代わる眼局所薬開発の可能性が示唆され、血管新生疾患治療に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 27 年 9 月 29 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			